

(11)Publication number : 56-106598

(43)Date of publication of application : 24.08.1981

(51)Int.Cl.

C12P 13/10
 //(C12P 13/10
 C12R 1/185)

(21)Application number : 55-009760

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 30.01.1980

(72)Inventor : MOMOSE HARUO
 ISHIDA MASAOKI
 TERABE MASATO

(54) PREPARATION OF L-ARGININE BY FERMENTATION METHOD

(57)Abstract:

PURPOSE: To collect the aimed substance in a culture medium, by cultivating a variant strain, belonging to the genus Escherichia, and having the resistance to α -methylmethionine, D-arginine, α -methylserine, etc.

CONSTITUTION: A variant strain of a microorganism, belonging to the genus Escherichia, and having the resistance to α -methylmethionine, p-fluorophenyl-alanine, D-arginine, argininehydroxamic acid, S-(2-aminoethyl)-cysteine, α -methylserine, β -2-thienylalanine or sulfaguanidine, e.g. Escherichia coli AJ11531 Escherichia coil AF11538, is cultivated. Among them, a variant whose L-arginine synthetic control gene is inactivated has a high L-arginine producing activity. The variant is cultivated in an ordinary culture medium under ordinary culture conditions, and the L-arginine is collected from the culture fluid by the conventional method.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑯ Int. Cl.¹
C 12 P 13/10
2(C 12 P 13/10
C 12 R L/185)

識別記号 庁内整理番号
6712--4B

⑰ 公開 昭和56年(1981)8月24日
発明の数 1
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑱ 発酵法による L-アルギニンの製造法

⑲ 特 願 昭55-9760
⑳ 出 願 昭55(1980)1月30日
㉑ 発 明 者 百瀬春生
鎌倉市玉堤 2-24-2
㉒ 発 明 者 石田雅昭

川崎市川崎区観音 2-20-8
㉓ 発 明 者 寺郎真人
横浜市緑区美しが丘 1-14
㉔ 出 願 人 味の素株式会社
東京都中央区京橋 1 丁目 5 番 8
号

明 細 書

1. 発明の名称

発酵法による L-アルギニンの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) エンエリヒア属に属し、*コーノチアルメタオニ*、*ジ-フルオロフルミエール-アケル*、*D-アルギニン*、*アルギニンヒドロキサン酸*、5-((2-アミノエチル)-)ノースタイン、*コーノチアルセリン*、*β-2-オキエニルアラニン*、又はスルツアグアニンに耐性を有する菌株を培養し、培養液中に生成された L-アルギニンを回収することを特徴とする発酵法による L-アルギニンの製造法。
(2) 菌株が、エンエリヒア属に属し、*コーノチアルメタオニ*、*ジ-フルオロフルミエール-アラニン*、*D-アルギニン*、*アルギニンヒドロキサン酸*、5-((2-アミノエチル)-)ノースタイン、*コーノチアルセリン*、*β-2-オキエニルアラニン*又はスルツアグアニンに耐性を有するとともに、L-アルギニン生成阻害因子を失活せしめたものである

る特許請求の範囲第 1 項記載の発酵法による L-アルギニンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

この発明は発酵法による L-アルギニンの製造法に関する。

発酵法による L-アルギニンの製造法としては、*ブレビバクタリウム属*、*コリスバクタリウム属*、*エンエリヒア属*等の菌株を使用する方法が知られている(特公昭 52-38113 等)。

本発明者らは、エンエリヒア属に属し、*コーノチアルメタオニ*、*ジ-フルオロフルミエール-アラニン*、*D-アルギニン*、*アルギニンヒドロキサン酸*、5-((2-アミノエチル)-)ノースタイン、*コーノチアルセリン*、*β-2-オキエニルアラニン*、又はスルツアグアニンに耐性を有する菌株の多くが、高い L-アルギニン生成能を有することを知った。これらの耐性菌株の菌株特性、L-アルギニン生成阻害因子を失活せしめた菌株がより高い L-アルギニン生成能を有する。

本発明において用いられる変異体としては例え
ば以下のものがある。

エンシヒア・コリ AJ11531 (FERM-P 5277)
(MM⁺, arg⁺ R⁺)

エンシヒア・コリ AJ11532 (FERM-P 5278)
(DPP⁺, arg⁺ R⁺)

エンシヒア・コリ AJ11533 (FERM-P 5279)
(D-Arg⁺, arg⁺ R⁺)

エンシヒア・コリ AJ11534 (FERM-P 5280)
(AMX⁺, arg⁺ R⁺)

エンシヒア・コリ AJ11535 (FERM-P 5281)
(AEC⁺, arg⁺ R⁺)

エンシヒア・コリ AJ11536 (FERM-P 5282)
(MS⁺)

エンシヒア・コリ AJ11537 (FERM-P 5283)
(TA⁺, arg⁺ R⁺)

- 3 -

正常の arg⁺ R⁺ 遺伝子を持つ細胞では、培養中に
多数のアルギニンが分解すると、L-アルギニン
生成能と関する細胞の遺伝子が阻害される（レ
プレッション）のに対し、arg⁺ R⁺ 遺伝子に欠陥を
持った細胞では、L-アルギニン存在下でも
上記阻害の程度が十分低くなる。したがって、L-
アルギニン添加、無添加の両条件下で培養した
細胞について、上記阻害の程度を比較すること
を決定し、arg⁺ R⁺ 正常細胞（野生型）の割合と
比較することにより、容易に arg⁺ R⁺ 欠陥変異体で
あることを確認することができる。図1は、培養
の際としてメチルオルニチン（メチル
オルニチンデアミン）を選び、AJ11531
について上記の測定を行った結果を示す。

arg⁺ R⁺ 変異体は、突然変異により変異体と
なる場合のほか、既に分離した arg⁺ R⁺ 株から過
剰な変異体と変異体とによって arg⁺ R⁺ 変異体を
選択的に抽出させることもできる。たとえば前述
の AJ11531 については、K12 株（高頻度
変異体と変異体の遺伝子）より既に分離さ

- 4 -

エンシヒア・コリ AJ11535 (FERM-P 5281)
(SUG⁺, arg⁺ R⁺)

MM⁺ : L-アルギニン/メチルデアミン阻害

DPP⁺ : D-プロリン/メチルデアミン阻害

D-Arg⁺ : D-アルギニン阻害

AMX⁺ : アミノキシム/メチルデアミン阻害

AEC⁺ : L-アミノエチル/メチルデアミン阻害

MS⁺ : L-メチルデアミン阻害

TA⁺ : L-タロニン/メチルデアミン阻害

SUG⁺ : L-スグルン/メチルデアミン阻害

arg⁺ R⁺ : L-アルギニン/メチルデアミン阻害

arg⁺ R⁺ : L-アルギニン/メチルデアミン阻害

本発明でいうアルギニン合成阻害因子の欠陥
とは、エンシヒア・コリ K12 株の arg⁺ R⁺ 遺
伝子 (Biochemical Reviews, Vol. 40, 116-127,
Maron, 1976) の染色体地図上 50% の位置にある
上、この遺伝子の産物である酵素である L-アル
ギニン合成阻害のレプレッサー遺伝子が発現する
ことを阻害する。

- 5 -

図1は arg⁺ R⁺ 変異体から、阻害剤によつて
arg⁺ R⁺ 遺伝子を抽出させて得られたものである。
用いた阻害剤は、染色体上 arg⁺ R⁺ 遺伝子（染色体
地図 4.8 分）近傍を光照射し、arg⁺ R⁺ 遺伝子
（7.4 分）の方向に向けて変異体に染色体を伝
する阻害剤を有する細胞体である。

図1 エンシヒア・コリ K12 (野生型) の arg⁺ R⁺

変異体の arg⁺ R⁺ 変異体の抽出

変異体	培養条件	変異体 arg ⁺ R ⁺ 変異体の抽出
K12	200μg/ml アルギニン/メチルデアミン阻害	0.08 0.1
AJ11531	200μg/ml アルギニン/メチルデアミン阻害	1.5 1.7

※ 高頻度変異体はデュービスの高頻度変異体、5 × 10⁶ 変異体
メコ中 1 × 10⁶ 変異体で 1 時間 30 分培養後抽出
した。

※ 変異体細胞を高頻度変異体後、その上清について L-ア
ミノアルギニンを基質としてメチルオルニチン
デアミン阻害剤を測定した。

- 6 -

比活性は生産アルギニン (L-Arginine) の
 1/2 である。

しかも、あらかじめスベタノマイシン耐性株
 100 (7.2分) 及びD-アミノ酸耐性株 100-1
 (4.4分) が作られているので、高活性より低活
 性株を育むに、スベタノマイシン耐性株とノ
 チアミン耐性株のコロニーをスベタノマイシ
 ン濃度 1.0×10⁻⁵g/ml 含有の最少培養液上で選別
 することにより、容易に 100 以下を示す (7.8分)
 の製造された変異体耐性株を分離することがで
 きる。

アルギニン合成阻害遺伝子に共通変異をもつた
 菌株では、通常に生産されたL-アルギニンの存
 在にもかかわらずアルギニン合成阻害剤の合成が
 抑制 (レプレッション) を受けるので、L-ア
 ルギニンの生産性によって有利であるが、このほ
 かL-アルギニンの分解活性を低下せしめる変異
 を含有させることも、生産性向上に利する。

次に、本発明に供する菌株の各菌株に対する
 比活性を表 2 に示した。

- 7 -

菌株 (株/4g)	コロニー形成能	
DL-α-アミノアラニン	AJ 611522	K12
0	+	+
200	+	-
1000	-	-
D-アラニン	AJ 611535	K12
0	+	+
20000	+	-
L-アルギニントロパラム酸	AJ 611534	K12
0	+	+
700	+	-
10000	-	-
β-2-アミノスチロシン	AJ 611536	K12
0	+	+
200	+	-
500	-	-

- 8 -

これらの結果は、D-β-ヒスの最少培養 (下記組成)
 の各菌株を中に示した濃度になるように溶解して
 固体培地を作り、その上でテストすべき菌株の植
 菌培養を遂行した結果、3.7で3.8時間培養するこ
 とにより、どれだけのL-アルギニン生産性の高
 低活性のスコア形成能 (+と-で表示) を求
 める1:1と比較したものである。

最少培養組成 (1.0g/l): グルコース 2g (別
 組成), (NH₄)₂SO₄ 1g, KH₂PO₄
 0.46g, K₂HPO₄ 1.26g, クエン酸ナトリウム
 2H₂O 0.59g, MgSO₄ 0.7H₂O 0.1g, 葉酸 2.4
 g (pH 7.2調整)

表 2. 各種アルギニン変異体の比活性

菌株 (株/4g)	コロニー形成能	
DL-α-アミノアラニン	AJ 611531	K12
0	+	+
40	+	-
100	-	-

- 9 -

菌株 (株/4g)	コロニー形成能	
DL-α-アミノアラニン	AJ 611534	K12
0	+	+
20000	+	-
β-2-アミノアラニン	AJ 611537	K12
0	+	+
200	+	-
1000	-	-
スルファダメゾン	AJ 611538	K12
0	+	+
50	+	-
100	-	-

注: テロシン変異体から製造された菌株のため
 最少培養中にL-テロシン 150μg/4g 添加。

- 10 -

本発明という薬剤特性とは、上記地層条件下に於いて、ある程度なれた薬剤濃度を与えたときと同等であるエンエリミア・コラーキ１又はコロニー形成を示さないのに対し、実用範囲の濃度でコロニー形成を示す場合をいう。

レーアルゲニン生成のための培養地は特製飼料とせず、炭素源、窒素源、無機塩及び必要ならば有機微量要素を含む通常の地盤が用いられる。炭素源として含水炭素（グルコース、シメツコース、フラクトース、ラクトース及びこれらを含むアンプルやセルロース等の加水分解物、麦芽、ホエイ等）、有機酸（酢酸、アミン酸等）、アルコール（グリセリン、エタノール等）が使用できる。窒素源としては、アンモニウム塩（硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、塩化アンモニウム）、アンモニアガス、アンモニア水等が使用できる。無機塩としては、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩、微量金属等を必要に応じて使用する。有機微量要素としては、栄養要素性のある場合

- 11 -

には酵母アミノ酸、ビタミン、植物抽出物、有機微量要素と混合使用し、必要に応じてさらに特定の無機塩類として、ア、ノ酸、ビタミン及びこれらを含む入量加水分解物、酵母エキス、ペプトン、カゼイン酸等を使用する。

培養条件は通常の方式でよく、pHを7.0とし、温度は30°C以内とし、培養液をpH2.0とし、pH6.0を調整すればよい。培養中にpHが下がる場合は、炭酸カルシウムを添加して加えるか、又はアンモニアガス、アンモニア水のアルカリで中和する。

レーアルゲニンの培養液からの採取は常法により行うことができる。

実施例1.

グルコース 5g/4L, (NH₄)₂SO₄ 2.0g, 2.5g/4L, KH₂PO₄ 0.2g/4L, MgSO₄ 1H₂O 0.1g/4L, 酵母エキス 0.05g/4L, ナイアシン塩酸塩 1.0g/4L, F=80, 7H₂O 1mg/4L, Mn=80, 1H₂O 1mg/4L, 炭酸カルシウム 2.5g/4L を含有し、レーアルゲニン培養液を培養

- 12 -

する地盤については150mg/4Lのレーアルゲニンを同時に添加した。pH7.0の水層地盤地を300mg/4Lまで20%分注し、これら各培養液を1回ずつ入れ、一定濃度一定時間培養した。培養終了時に得るレーアルゲニンの量は表3の如くであった。

表3 レーアルゲニン生成実験

培養液	培養濃度 (mg/4L)	培養時間 (hr)	レーアルゲニン濃度 (mg/4L)
AJ 11531	31.5	94	130
AJ 11532	31	96	28
AJ 11533	34	72	19
AJ 11534	34	90	31
AJ 11535	34	72	24
AJ 11536	31.5	72	12
AJ 11537	31.5	84	7
AJ 11538	31.5	90	10

何社出願人 味の素株式会社

- 13 -